Die Synthese von Poly-ß-hydroxybuttersäure durch Hydrogenomonas H 16: Die zu ß-Hydroxybutyryl-Coenzym A führenden Reaktionsschritte

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von
Joachim Schindler
aus Königsberg/Pr.

Göttingen 1964

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der
Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt.

D 7

Referent: Professor Dr. H.G. Schlegel

Korreferent: Professor Dr. A. Pirson

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1964

Archiv für Mikrobiologie 49, 236–255 (1964)

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Die Synthese von Poly-β-hydroxybuttersäure durch Hydrogenomonas H 16: Die zu β-Hydroxybutyryl-Coenzym A führenden Reaktionsschritte*

Von

JOACHIM SCHINDLER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Mai 1964)

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1964.

Knallgasbakterien vermögen unter Ausnutzung der Knallgasreaktion Poly-β-hydroxybuttersäure (PHBS)[1] aus Kohlendioxyd zu synthetisieren. Acetat wird ebenfalls in PHBS eingebaut, und zwar auf direktem Wege. Lactat und Pyruvat werden nach einmaliger und Succinat nach zweimaliger Decarboxylierung in die Biosynthese von PHBS einbezogen (Gottschalk 1964a). Da Knallgasbakterien Kohlendioxyd über den Calvincyclus fixieren (Bergmann et al. 1958; Hirsch et al. 1963), erhebt sich die Frage, auf welche Weise Acetyl-Einheiten aus den Intermediärverbindungen des Calvincyclus bzw. deren Derivaten entstehen könnten. Mit dem Befund, daß Acetat, β-Hydroxybutyrat und PHBS schon nach kurzfristigem Einbau von $C^{14}O_2$ uniform markiert sind (Gottschalk 1964b), stände die Herleitung zweier verschiedener Acetat-Donator-Reaktionen aus dem Calvincyclus in Einklang (Schlegel u. Gottschalk 1962). Acetyl-CoA könnte entweder aus 3-P-Glycerat über Pyruvat in einer Decarboxylierungsreaktion oder in einer Phosphoketolasereaktion aus Fructose-6-P oder Xylulose-5-P gewonnen werden. Da die Phosphoketolase bereits in Bakterien nachgewiesen ist (Heath et al. 1956; Schramm 1958; Hurwitz 1958), und da während der Pyruvatspaltung

[1] Abkürzungen: Ac-CoA = Acetyl-CoA, AcAc-CoA = Acetacetyl-CoA, ÄDTA = Äthylendiamintetraacetat, ATP = Adenosintriphosphat, CoA = Coenzym A, F-6-P = Fructose-6-phosphat, Gal-3-P = Glycerinaldehyd-3-phosphat, β-HBS-CoA = β-Hydroxybutyryl-Coenzym A, D(-)-β-HBS-DH = β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase, β-HBS-CoA-DH = β-Hydroxybutyryl-Coenzym A-Dehydrogenase, NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NADP = Nicotinamid-Adenin-Trinucleotid, p-NA = p-Nitroanilin, PHBS = Poly-β-hydroxybuttersäure, TPP = Thiaminpyrophosphat, R-5-P = Ribose-5-phosphat, Ru-5-P = Ribulose-5-phosphat, Xu-5-P = Xylulose-5-phosphat.

ein Teil des fixierten Kohlendioxyds durch Decarboxylierung wieder verloren geht, erschien eine Beteiligung der Phosphoketolasereaktion an der PHBS-Synthese durch *Hydrogenomonas* prüfenswert.

Außerdem waren weitere an der Biosynthese von PHBS beteiligte Reaktionen zu untersuchen. Neben den Acetat-Donator-Reaktionen interessierte die Synthese von β-Hydroxybutyryl-CoA aus Acetyl-CoA. Die Dehydrogenase der freien β-Hydroxybuttersäure, die in verschiedenen PHBS-speichernden Bakterien gefunden worden ist und am Abbau des Speicherprodukts beteiligt sein soll, wurde in die Untersuchungen einbezogen.

A. Organismen und Methoden

I. Organismen

Die Hauptuntersuchungen erfolgten an dem im Institut isolierten Bakterium *Hydrogenomonas H 16*. Die Zellen wurden in Großansätzen unter chemolithotrophen und organotrophen Bedingungen in folgender Grundnährlösung (G) herangezogen: $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 10,0 g; KH_2PO_4 1,5 g; NH_4Cl 1,0 g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,2 g; Aqua dest. 1000 ml. Dem Basalmedium wurden nach getrenntem Sterilisieren je 1 Vol-% der Lösungen A und B zugesetzt: A. $FeNH_4$-citrat 0,05% + $CaCl_2$ 0,1%; B. $NaHCO_3$ 5%. Hoaglandsche Spurenelementlösung (C) wurde zu 0,2% zugefügt.

In den Versuchen wurde Zellmaterial verwendet, das auf drei verschiedenen Kohlenstoffquellen gewachsen war. Die chemolithotrophe Anzucht von *Hydrogenomonas* erfolgte unter einer Gasatmosphäre von 70% H_2, 20% O_2 und 10% CO_2 in der Grundnährlösung G und den Zusätzen A, B und C. Organotroph wurden die Zellen auf der Kombination G + A + C mit 1% Na-Succinat oder 1% Na-Acetat als C-Quelle unter Belüftung herangezogen. Einer Alkalisierung der organotrophen Kulturmedien während des Wachstums wurde durch wiederholtes Neutralisieren mit 1 n HCl begegnet. Größere Zellmengen wurden in Submerskultur (Schlegel et al. 1961) in 6 l Zweihalskolben bei 27°C unter Magnetrührung herangezogen; beimpft wurde mit einer 24stündigen Vorkultur. Die Kulturen wurden bei einer Extinktionsdichte von 2—2,4 (Eppendorf-Photometer 436 mμ, $d = 1$ cm) durch Zentrifugation geerntet (Christ-Junior 3, 6000 U/min, 20 min) und mit 0,05 m PO_4-Puffer pH 7 zweimal gewaschen.

Weiterhin wurden folgende aus der Institutssammlung stammende Bakterien für vergleichende Untersuchungen benötigt und in größeren Mengen herangezogen: *Leuconostoc mesenteroides* (Altermatt et al. 1955), *Lactobacillus plantarum* (Stumpf u. Horecker 1956), *Bacillus megaterium* (Macrae u. Wilkinson 1958), *Micrococcus denitrificans* (Kaltwasser et al. 1962), *Azotobacter chroococcum* und *A. vinelandii* (Claus, persönliche Mitteilung) und *Aspergillus niger*[1] (Ramakrishnan u. Martin 1954). Haselnüsse wurden Anfang Oktober, kurz vor der vollen Reife, in die enzymatischen Untersuchungen miteinbezogen.

Die Anzucht von *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactobacillus plantarum* erfolgte in 10 l Standkulturen, von *Bacillus megaterium*, *Micrococcus denitrificans* und *Azotobacter* submers in 6 l Zweihalskolben unter Magnetrührung und von *Aspergillus niger* in 100 ml Schüttelkulturen.

Die Bakterienkulturen wurden in der aktivsten Wachstumsphase mit der Cepa-Schnellzentrifuge (C. Padberg, Lahr/Baden) (40000 U/min) geerntet, zweimal mit

[1] Für die Überlassung des Stammes danke ich Herrn Dr. Hustede, Chem. Fabrik Benckiser, Ladenburg a. N.

Aqua dest. gewaschen und in 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7,0; m/1000 Cystein; m/2000 ÄDTA) bei −20° C aufbewahrt. Das körnige Mycel von *Aspergillus niger* wurde auf Bücherfiltern abfiltriert, zweimal mit Aqua. dest. gewaschen, auf Fließpapier getrocknet und bei −20° C eingefroren.

II. Methodik

1. Herstellung zellfreier Extrakte

a) Bereitung von Bakterien-Rohextrakten. Ultraschall (HÜBENER 1959): Die in Phosphatpuffer aufgenommenen Zellen wurden mit einem Ultraschallgerät der Fa. Schoeller, Frankfurt a. M., 8 min bei Temperaturen zwischen 0—5° C beschallt (20 KHz, 50 Watt/cm³). Um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden, wurde jeweils $^1/_2$ min beschallt und 1 min gekühlt.

Hydraulische Zertrümmerung (HUGHES 1951): Die dickflüssige Zellsuspension wurde in der Hughespresse (Shandon Scientific Comp. London) auf −30° C unterkühlt und die gefrorene Zellmasse hydraulisch zerpreßt und dadurch aufgeschlossen.

Zerreiben mit Alcoa-A-303 (MCILWAIN 1948): Beim Zellaufschluß durch Reiben mit Alumina wurde die gefrorene Zellmasse mit zwei Gewichtsteilen Alumina 15 min im Mörser angerieben und mit der gleichen Menge Puffer aufgenommen.

In allen Fällen wurden die Zellrückstände durch Zentrifugieren bei 2° C abgetrennt (Phywe-Eispirouette, 13000 U/min, 1 Std).

b) Rohextrakt aus *Aspergillus niger*. Das trockene Pilzgewebe wurde mit dem $1^1/_2$fachen Volumen Quarzsand 20 min angerieben und mit dem halben Volumen 0,02 m Phosphatpuffer pH 7,0 extrahiert.

c) Bereitung von Haselnuß-Extrakt. 70 g entschalter und fein zerriebener Nüsse wurden mit 40 g gewaschenem Sand eingefroren, 10 min zerrieben und mit 14 ml Phosphatpuffer pH 7,3 extrahiert. Der zähflüssige Brei wurde durch ein Leinentuch gepreßt. Die Abtrennung des Extraktes von Sand, Zellpartikeln sowie von der Fettemulsion erfolgte durch mehrfaches Zentrifugieren: 5 min bei 3000 U/min, 30 min bei 15000 U/min und 30 min bei 25000 U/min.

2. Reinigung der Rohextrakte durch Ionenaustauscher

Die Rohextrakte wurden durch die Bicarbonatform des Ionenaustauschers Dowex 1 (Vernetzung: 10, Siebform 100—200 mesh) von Cofaktoren befreit und die alkalisch gewordene Enzymlösung mit Cystein und 0,1 n HCl neutralisiert.

3. Anreicherung von Enzymen

Arylamintransacetylase wurde aus Taubenleber-Acetonpulver durch fraktionierte Acetonfällung angereichert (CHOU u. LIPMANN 1952). Die zwischen 0—44% Sättigung erhaltene Proteinfraktion enthielt das aktive Enzym. Sie wurde in Phosphatpuffer (pH 6,8; m/1000 Cystein; m/2000 ÄDTA) aufgenommen und über Dowex 1 von den Cofaktoren befreit. Das Acetontrockenpulver wurde nach KAPLAN u. LIPMANN (1948) aus frischen Taubenlebern bereitet.

Phosphoriboisomerase konnte aus Spinatblättern angereichert werden (HURWITZ et al. 1956), während Xylulose-5-P-3-epimerase nach HURWITZ u. HORECKER (1956) aus *Lactobacillus pentosus* gewonnen wurde.

D(—)-β-HBS-DH wurde aus *Hydrogenomonas H 16* durch $MnCl_2$-Fällung, $(NH_4)_2SO_4$-Fällung, Dialyse und Adsorption an Calciumphosphat-gel isoliert (SCHINDLER u. SCHLEGEL 1963).

4. Reagentien

Xu-5-P wurde in einem Enzymansatz mit Phosphoriboisomerase und Xylulose-5-P-3-epimerase aus R-5-P gewonnen (Hurwitz u. Horecker 1956).

Acetyl-CoA konnte aus Coenzym A und Essigsäureanhydrid bereitet werden (Simon u. Shemin 1953).

Acetacetyl-CoA war aus Coenzym A und Diketen herstellbar (Decker 1959).

D,L-β-Hydroxybutyryl-CoA wurde aus Coenzym A und β-Butyrolacton hergestellt (Decker 1959).

D(-)-β-HBS war durch enzymatische Hydrolyse von PHBS mit Hilfe einer Depolymerase erhältlich (Chowdhury 1963).

Acetacetat wurde durch alkalische Hydrolyse von Acetessigsäureäthylester gewonnen (Ljungren 1924).

5. Enzymatische Bestimmungsmethoden

Bestimmung der Pyruvat-Dehydrogenase. a) Ermittelter Testansatz zur photometrischen Bestimmung von Acetyl-CoA mit Hilfe von Arylamintransacetylase und p-Nitroanilin: 1,00 ml 0,1 m K-PO_4-Puffer pH 7,0; 0,05 ml 0,2 m Cystein; 0,08 ml 0,001 m CoA; 0,04 ml 0,001 m TPP; 0,10 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,20 ml 0,10 m Na-Pyruvat; 0,03 ml 0,02 m NAD; 0,20 ml 0,001 m p-Nitroanilin; 0,15 ml Arylamintransacetylase, Enzymlösung und Aqua dest. ad 2,00 ml. Die Messungen wurden im Eppendorf-Photometer bei 405 mμ, d = 1 cm und bei Zimmertemperatur vorgenommen.

b) NAD-Reduktionssystem: 1,20 ml 0,1 m K-PO_4-Puffer pH 7,0; 0,05 ml 0,2 m Cystein; 0,10 ml 0,001 m CoA; 0,04 ml 0,001 m TPP; 0,10 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,20 ml 0,1 m Na-Pyruvat; 0,10 ml 0,02 m NAD; Phosphotransacetylase (0,05 mg Protein), Enzymlösung (0,1 mg Protein) und Aqua dest. ad 2,00 ml. Die Messungen erfolgten im Eppendorf-Photometer bei 366 mμ, d = 1 cm und Zimmertemperatur.

c) Manometrische Messung der CO_2-Entwicklung: Die CO_2-Entwicklung wurde in Warburggefäßen unter N_2-Atmosphäre verfolgt. Das Hauptgefäß enthielt folgende Lösungen: 1,60 ml 0,1 m K-PO_4-Puffer pH 7,0; 0,10 ml 0,2 m Cystein; 0,15 ml 0,001 m CoA; 0,08 ml 0,001 m TPP; 0,15 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,50 ml 0,1 m Na-Pyruvat; 0,08 ml 0,02 m NAD; Lactat-DH (0,04 mg Protein), Phosphotransacetylase (0,05 mg Protein) und Aqua dest. ad 3,30 ml. Die Reaktion lief bei Zimmertemperatur ab und wurde durch Zukippen des im Seitenarm befindlichen Enzymextraktes (0,2 mg Protein) gestartet.

d) Messung der O_2-Aufnahme durch intakte Zellen: Die Zellsuspension wurde in das Hauptgefäß, 0,3 ml Na-Pyruvat (= 30 μM) in den Seitenarm der Warburggefäße pipettiert. Zur Absorption des gebildeten CO_2 befanden sich 0,2 ml 2 n KOH im Zentralgefäß. Gemessen wurde die O_2-Aufnahme unter Luft bei Zimmertemperatur.

Die Aktivität der Arylamintransacetylase wurde mit Hilfe von Phosphotransacetylase und p-Nitroanilin im Eppendorf-Photometer bei 405 mμ bestimmt (Colowick u. Kaplan 1955).

Zur Bestimmung der Lactat-DH und Acetat-thiokinase wurde der vorne beschriebene, mit Arylamintransacetylase gekoppelte Test angewendet. An Stelle von Pyruvat wurden die entsprechenden Substrate Na-Lactat oder Na-Acetat eingesetzt. Bei Messung der Acetat-thiokinase wurden außerdem TPP und NAD durch 8 μM ATP ersetzt.

Phosphoketolase wurde in folgendem ermittelten Testansatz mit Hilfe von Arylamintransacetylase, Phosphotransacetylase und p-Nitroanilin bei 405 mμ bestimmt: 1,00 ml 0,1 m K-PO_4-Puffer pH 6,0; 0,05 ml 0,2 m Cystein; 0,08 ml 0,001 m TPP; 0,05 ml 0,001 m CoA; 0,10 ml 0,1 m $MgCl_2$; 0,30 ml 0,1 m Substrat;

0,20 ml 0,001 m p-Nitroanilin; Enzymextrakt (0,06 mg Protein) und aliquote Mengen Phosphotransacetylase und Arylamintransacetylase und Aqua dest. ad 2,60 ml. Als Substrat diente Fructose-6-P, Ribose-5-P oder ein Gemisch von Ribose-5-P, Ribulose-5-P und Xylulose-5-P.

Durch photometrische Messung der NAD (NADP)-Reduktion bzw. NADH (NADPH)-Oxydation bei 366 mμ konnten folgende Enzymaktivitäten bestimmt werden: β-Ketothiolase (LYNEN 1953), Acetyl-CoA-Carboxylase (GIBSON et al. 1958), β-Hydroxybutyryl-CoA-DH (BERGMEYER 1962), D-(—)-β-HBS-DH (SCHINDLER u. SCHLEGEL 1963). Die von den angeführten Autoren übernommenen Testmethoden wurden zum Teil leicht verändert.

6. Proteinbestimmungen

Der Proteingehalt der Bakteriensuspension wurde nach der Biuret-Methode von LA RIVIÈRE (1958) bestimmt.

Proteinbestimmungen in zellfreien Extrakten erfolgten nach dem Verfahren von BÜCHER (1947). Das Protein wurde vor der Bestimmung mit Trichloressigsäure ausgefällt, um den störenden Einfluß zu hoher Salzkonzentrationen auszuschließen. Die Messungen wurden am Eppendorf-Photometer bei 546 mμ und $d = 2$ cm vorgenommen.

B. Ergebnisse und Versuche

Die eingangs geschilderten Tatsachen, daß Knallgasbakterien Kohlendioxyd über den Calvincyclus fixieren und in Abwesenheit einer Stickstoffquelle PHBS anhäufen, und daß bei Kurzzeitversuchen mit radioaktivem Kohlendioxyd Acetat, β-Hydroxybutyrat und PHBS schon nach 8 sec uniform markiert sind, regten zu Versuchen über die im Rahmen der PHBS-Synthese möglichen Acetat-Donator-Reaktionen an.

1. Nachweis der Pyruvat-Dehydrogenase

Die Decarboxylierung von Pyruvat, katalysiert durch Pyruvat-DH, ist die am weitesten verbreitete Acetat liefernde Reaktion im Intermediärstoffwechsel. Für den Nachweis des Enzyms in Rohextrakten von *Hydrogenomonas* schien ein gekoppelter Enzymtest zum Abfangen des entstehenden Acetyl-CoA besonders geeignet. Dadurch wird eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Pyruvatspaltung erreicht und der störende Einfluß der in den Rohextrakten enthaltenen Begleitenzyme, wie z.B. Deacylasen, verringert. Außerdem wurde nach einem optischen Test gesucht, um an einer größeren Zahl von Proben die Kinetik der Acetyl-CoA-Bildung verfolgen zu können. Als Hilfsenzym für diesen gekoppelten optischen Test bot sich die Arylamintransacetylase an, die den Acetyl-Rest von Acetyl-CoA auf p-Nitroanilin überträgt. Bei dieser Acetylierung des p-Nitroanilin wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 388 mμ auf 318 mμ verschoben; die Extinktionsabnahme bei 405 mμ ($E^{405}_{\text{Mol}} = 6000$) kann als Maß für die übertragenen Acetyl-Einheiten genommen werden:

$$\text{Pyruvat} \xrightarrow{CO_2} \text{Acetyl-CoA} \longrightarrow \begin{cases} \text{P-NA}\,(E^{405}_{\text{Mol}} = 6000) \\ \searrow \text{Acetanilid} + \text{CoA (farblos)} \end{cases}$$

Die Arylamintransacetylase wurde durch fraktionierte Acetonfällung aus Taubenleber angereichert. Die Aktivität des über Dowex 1 gereinigten Enzyms wurde mit Acetyl-P und Phosphotransacetylase ebenfalls in einem gekoppelten Test photometrisch geprüft.

Zum Nachweis der Pyruvat-DH in Rohextrakten von *Hydrogenomonas* wurden chemolithotroph gewachsene Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. An der durch Pyruvat-DH katalysierten Reaktion sind mehrere Cofaktoren beteiligt (Gunsalus 1954):

$$\text{Pyruvat} + \text{CoA-SH} + \text{NAD} \xrightarrow[\alpha\text{-Liponsr.}]{\text{TPP, Mg}^{++}} \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}_2$$

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von den einzelnen Cofaktoren ließ sich im Rohextrakt zunächst kaum feststellen. Auch in Abwesenheit einzelner Cofaktoren zeigten alle Ansätze geringe Enzymaktivität. Erst eine Reinigung des Rohextraktes durch Dowex 1 ließ erkennbar werden,

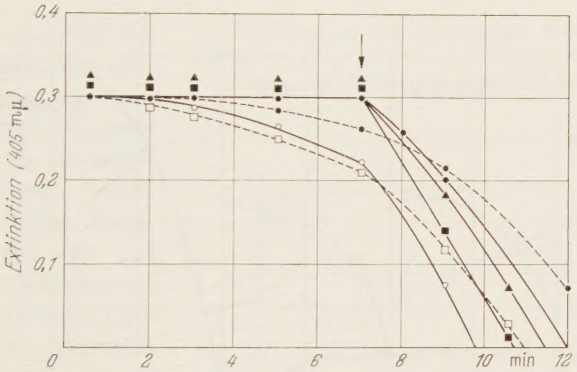


Abb. 1. Aktivität der Pyruvat-DH in Abhängigkeit von einzelnen Reaktionskomponenten: Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 1,00 ml PO_4-Puffer (pH 7,0, 100 μM); 0,05 ml Cystein (10 μM); 0,06 ml CoA (0,06 μM); 0,06 ml TPP (0,06 μM); 0,10 ml $MgCl_2$ (10 μM); 0,20 ml Na-Pyruvat (20 μM); 0,03 ml NAD (0,3 μM); 0,20 ml p-NA (0,2 μM); 0,15 ml Arylamintransacetylase (0,75 mg Protein); 0,01 ml Rohextrakt (2,5 mg Protein) und Aqua dest. ad 2,00 ml. Nach 7 min Vorinkubation der sonst vollständigen Ansätze wurden jeweils folgende Komponenten nachträglich zugegeben: —●— CoA; —■— NAD; —○— TPP; —□— $MgCl_2$; —●— Cystein und —▲— Na-Pyruvat

daß die Pyruvat-Dehydrogenase von *Hydrogenomonas* auf Coenzym A, NAD und TPP angewiesen ist und für einen optimalen Reaktionsablauf außerdem Mg^{++} und Cystein benötigt (Abb. 1). Zugesetzte α-Liponsäure beschleunigte die durch den Rohextrakt katalysierte Reaktion nicht.

Es wurden Optimumskurven für NAD, TPP, Coenzym A, Na-Pyruvat und Cystein aufgenommen und ein Enzymansatz den Erfordernissen entsprechend zusammengestellt (Abb. 2).

Phosphatpuffer ließ sich ohne Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch Tris-HCl-Puffer ersetzen. Die Reduktionsmittel Na-thioglykolat und Glutathion waren weniger wirksam als Cystein. Die Dehydrogenase

war kältestabil und ließ sich ohne große Aktivitätsverluste bei 0°C aufbewahren (Tab. 1). Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der durch Ultraschall, durch hydraulische Zertrümmerung und durch Zerreiben mit Alumina gewonnenen zellfreien Extrakte ergab folgende spezifische Aktivitäten: 0,160, 0,129 und 0,070 μM/min/mg Protein.

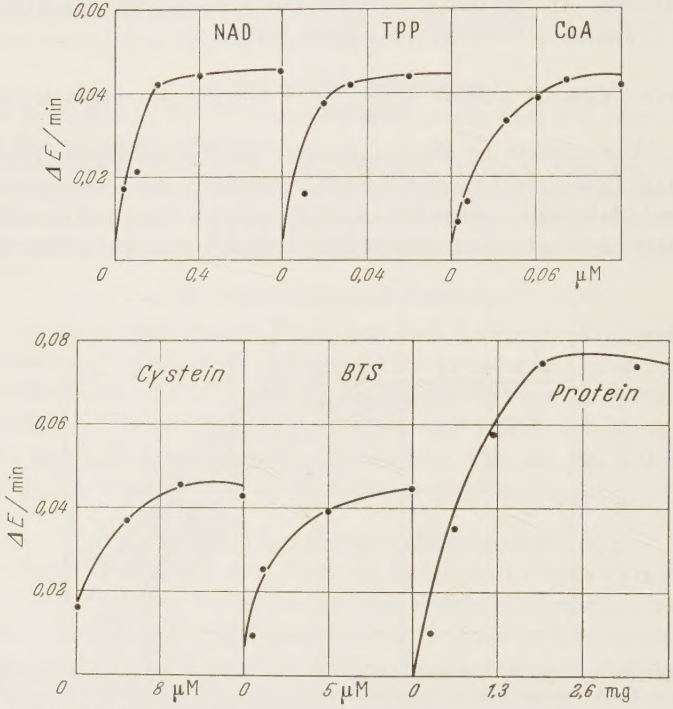


Abb. 2. Acetyl-CoA-Bildung in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Reaktionskomponenten: Enzym-Ansatz wie Abb. 1

Parallel zur Acetylierung von p-Nitroanilin wurde die Pyruvat-Decarboxylierung durch photometrische Messung der NAD-Reduktion bei 366 mμ verfolgt. Das Reaktionsgleichgewicht ließ sich durch Zusatz von Phosphotransacetylase zu Gunsten der Pyruvatspaltung verschieben (Abb. 3).

Neben der photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität wurde der bei der Pyruvatspaltung auftretende Gasumsatz manometrisch gemessen. Die Bestimmung der CO_2-Entwicklung erfolgte in Warburggefäßen unter N_2-Atmosphäre. Ein Zusatz von Lactat-DH zur Regenerierung des NAD und von Phosphotransacetylase zum Ableiten des gebildeten Acetyl-CoA waren notwendig (KORKES et al. 1952) (Abb. 4).

Einen Vergleich der durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden erhaltenen spezifischen Aktivitäten ermöglicht Tab. 2:

Durch vergleichende Untersuchungen an Extrakten, die aus chemolithotroph oder C-heterotroph gewachsenen Zellen gewonnen worden waren, ließen sich durch den mit Arylamintransacetylase gekoppelten Test neben der Pyruvat-DH auch die Lactat-DH und Acetat-thiokinase sowie die verschiedenartige Induzierbarkeit dieser Enzyme durch die Wachstumssubstrate nachweisen. *Hydrogenomonas* wurde entweder unter Knallgas und CO_2 oder unter Luft mit Na-Succinat oder Na-Acetat kultiviert.

Die Pyruvat-DH der mit Succinat gewachsenen Zellen war um mehr als das Doppelte aktiver als die der autotroph oder mit Acetat gezogenen Zellen. Ebenso enthielten die auf Succinat gewachsenen Zellen die aktivste Lactat-DH. Die Aktivität der Acetat-thiokinase war dagegen in den Acetat-Zellen am höchsten (Abb. 5—7) (Tab. 3).

Tabelle 1. *Haltbarkeit der Pyruvat-DH bei verschiedenen Temperaturen*

Lagerung (in Tagen)	spez. Aktivität[1]	
	Temperatur 0° C	Temperatur —20° C
0	0,072	—
1	0,065	—
2	0,022	0,072
6	0,007	0,072

Bestimmung des gebildeten Acetyl-CoA wie Abb. 5.

[1] Spez. Aktivität: μM Acetyl-CoA/min/mg Protein.

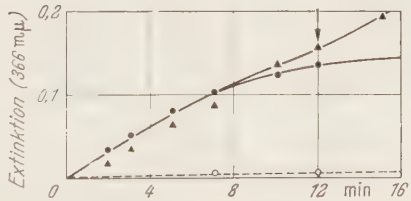


Abb. 3. Kinetik der NAD-Reduktion als Maß für die Pyruvat-Decarboxylierung: Der Enzymansatz ist im methodischen Teil angegeben. —●— Testansatz wie angegeben; —▲— zusätzlich Phosphotransacetylase; nach 12 min erneut Zugabe von NAD; ---○--- ohne Substrat

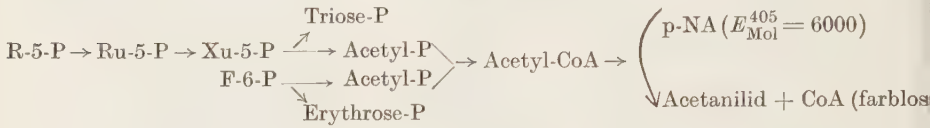
II. Prüfung auf Phosphoketolase

Einen weitaus kürzeren Weg der Acetat-Bildung aus Hexosen oder Pentosen stellt die phosphorolytische Spaltung von Fructose-6-P oder Xylulose-5-P durch Phosphoketolase dar. Das Enzym, das bisher in *Acetobacter xylinum*, *Pediococcus pentosaceus* und heterofermentativen Milchsäurebakterien nachgewiesen worden ist, katalysiert folgende Reaktion:

$$\left.\begin{matrix}\text{Xu-5-P}\\ \text{F-6-P}\end{matrix}\right\} \xrightarrow{\text{TPP, Mg}^{++}} \text{2-(}\alpha,\beta\text{-Dihydroxyäthyl)-TPP} + \left\{\begin{matrix}\text{Gal-3-P}\\ \text{Erythrose-4-P}\end{matrix}\right.$$

$$\text{2-(}\alpha,\beta\text{-Dihydroxyäthyl)-TPP} + \text{P}_\text{a} \longrightarrow \text{Acetyl-P} + \text{TPP}$$

Zum Nachweis der Phosphoketolase bot sich der schon beschriebene gekoppelte Enzymtest an. Da lediglich Phosphoketolase die Geschwindigkeit der Reaktion begrenzen sollte, war dem Enzymansatz neben Arylamintransacetylase auch Phosphotransacetylase im Überschuß zugegeben, so daß insgesamt folgender Reaktionsablauf gemessen wurde:



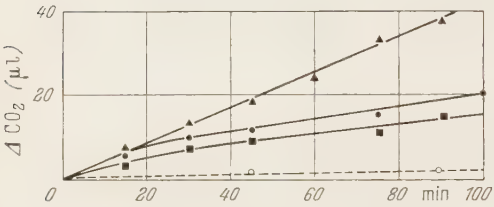


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der durch die Pyruvat-DH katalysierten CO_2-Entwicklung: Die CO_2-Entwicklung wurde in doppelarmigen Warburggefäßen unter N_2-Atmosphäre und bei Zimmertemperatur gemessen. Der Enzymansatz ist im methodischen Teil angegeben. —▲— vollständiger Ansatz; —■— ohne Phosphotransacetylase und Lactat-DH; —●— ohne Phosphotransacetylase; ---○--- ohne Substrat

Tabelle 2. *Aktivität der Pyruvat-DH in Abhängigkeit von den Bestimmungsmethoden*

Testmethode	spez. Aktivität[1]
Gekoppelter Enzymtest (Acetyl-CoA-Bildung)	0,072
NAD-Reduktionssystem (NAD-Reduktion)	0,057
Manometrischer Test (CO_2-Entwicklung)	0,038
Manometrischer Test (O_2-Aufnahme)	0,033

[1] Spez. Aktivität: µM Acetyl-CoA/min/mg Protein.

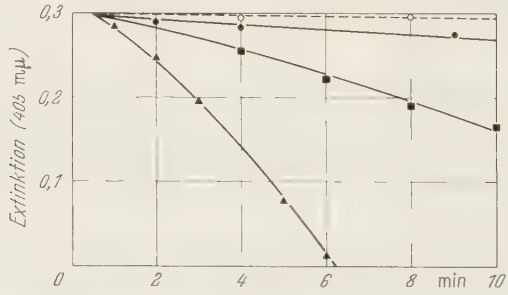


Abb. 5. Kinetik der Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat, Lactat und Acetat in Rohextrakten autotroph gewachsener Zellen von *Hydrogenomonas*: Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 1,00 ml K-PO_4-Puffer (pH 7,0, 100 µM); 0,05 ml Cystein (10 µM); 0,08 ml CoA (0,08 µM); 0,04 ml TPP (0,04 µM); 0,10 ml $MgCl_2$ (10 µM); 0,20 ml Na-Pyruvat (20 µM); 0,03 ml NAD (0,6 µM); 0,20 ml p-NA (0,2 µM); 0,15 ml Arylamintransacetylase (0,75 mg Protein); Rohextrakt (1 ml = 25 mg Protein) und Aqua dest. ad 2,00 ml. —▲— Na-Pyruvat; —■— Na-Lactat; —●— Na-Acetat; ---○--- ohne Substrat

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden zunächst an Organismen ermittelt, von denen bekannt war, daß sie das in *Hydrogenomonas* gesuchte Enzym mit Sicherheit besitzen: an *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactobacillus plantarum*. Die autotroph unter Knallgas und CO_2 und

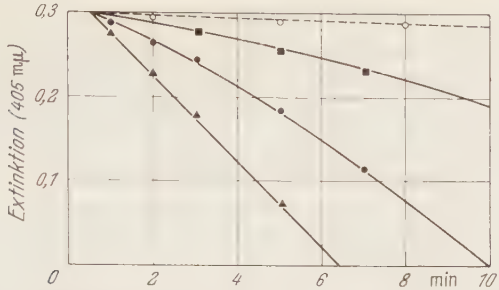


Abb. 6. Kinetik der Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat, Lactat und Acetat in Rohextrakten Acetat-gewachsener Zellen von *Hydrogenomonas*: Enzym-Ansatz wie Abb. 5

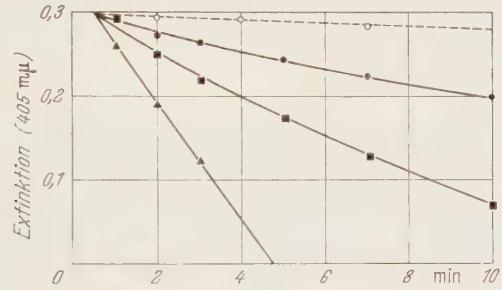


Abb. 7. Kinetik der Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat, Lactat und Acetat in Rohextrakten Succinat-gewachsener Zellen von *Hydrogenomonas*: Enzymansatz wie Abb. 5

Tabelle 3

Aktivitäten der Pyruvat-DH, Lactat-DH, Acetat-thiokinase und Phosphoketolase

Organismus	spez. Aktivität[1]				
	Pyruvat-Decarboxylase	Lactat-Dehydrogen.	Acetat-Thiokinase	Phosphoketolase	
				R-5-P	F-6-P
Hydrogenomonas					
CO_2 (C-Quelle)	0,072	0,031	0,013	0,00	0,00
Acetat (C-Quelle)	0,061	0,017	0,042	0,00	0,00
Succinat (C-Quelle)	0,160	0,047	0,018	0,00	0,00
Leuconostoc mesenteroides	0,066	0,00	0,040	0,254	0,007
Leuconostoc mesenteroides[2]	0,066	0,00	0,040	0,067	0,023
Lactobac. pent.	0,006	0,003	0,011	0,229	0,006
Bac. megat.	0,019	0,007	0,003	0,00	0,00
Microc. denitr.	0,011	0,003	0,003	0,00	0,00
Az. vinelandii	0,332	0,017	0,00	0,00	0,00
Az. chroococcum	0,011	—	—	0,00	0,00
Asp. niger	0,028	0,016	0,012	0,00	0,00
Corylus avellana	0,005	0,00	0,002	0,00	0,00

Bestimmung des gebildeten Acetyl-CoA wie Abb. 5.

Bestimmung des gebildeten Acetyl-P siehe Methodik.

[1] Spez. Aktivität: μM Acetyl-CoA/min/mg Protein.

[2] Der Testansatz zur Bestimmung der Phosphoketolase enthielt zusätzlich Na-Fluorid (30 μM) und Monojod-Acetat (14 μM).

heterotroph mit Succinat oder Acetat gewachsenen Zellen von *Hydrogenomonas* wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die Rohextrakte mit Hilfe des zusammengestellten Tests (siehe methodischer Teil) auf Phosphoketolase geprüft. In allen drei Fällen ließ sich weder mit Fructose-6-P noch mit Ribose-5-P oder Xylulose-5-P Enzymaktivität feststellen.

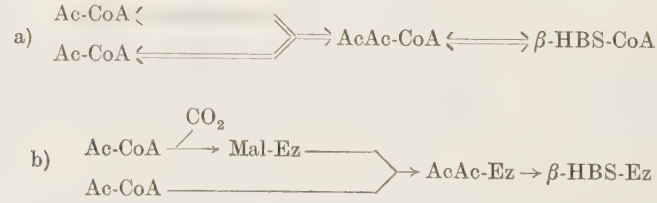
Weitere PHBS-speichernde Bakterien und Organismen, die über einen besonders differenzierten Kohlenhydratstoffwechsel verfügen, wurden in die Untersuchungen einbezogen. Weder in Rohextrakten von *Bacillus megaterium*, *Micrococcus denitrificans*, *Azotobacter vinelandii* und *Az. chroococcum* noch in Extrakten von *Aspergillus niger* und Haselnüssen ließ sich eine lösliche Phosphoketolase nachweisen. Dagegen wurde Pyruvat-DH, Lactat-DH und Acetat-thiokinase in unterschiedlichen Aktivitäten gefunden (Tab. 3).

III. Synthese von β-Hydroxybutyryl-CoA

Die Kette der zu höheren Fettsäuren führenden Syntheseprozesse wird durch eine biotinabhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA unter Bildung von Malonyl-CoA eingeleitet. In der sich anschließenden Reaktion entsteht durch Kondensierung von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA Acetacetyl-CoA. Diese und alle folgenden Reaktionen bis zur Bildung des fertigen Endprodukts, z. B. Palmityl-CoA, sollen an das Multienzym der Fettsäuresynthetase gekoppelt sein (LYNEN 1962).

Die Synthese von PHBS durch zellfreie Extrakte von *Bacillus megaterium* und *Rhodospirillum rubrum* erfolgt über β-Hydroxybutyryl-CoA; β-Hydroxybuttersäure, ATP und Coenzym A können den Thioester nicht ersetzen (MERRICK u. DOUDOROFF 1961).

Die vorliegenden Befunde warfen die Frage auf, ob die PHBS-Synthese durch *Hydrogenomonas* a) durch Umkehr der Knoopschen β-Oxydation und direkter Kondensation zweier Moleküle Acetyl-CoA, katalysiert durch β-Ketothiolase, eingeleitet wird oder aber b) ebenso wie der Aufbau höherer Fettsäuren über Malonyl-CoA führt:



Die zur Diskussion stehenden Enzymreaktionen wurden in Rohextrakten autotroph gezogener Zellen von *Hydrogenomonas* untersucht.

Thiolase wurde durch Verfolgen der durch NADPH-Oxydation bedingten Extinktionsabnahme bei 366 mμ in Gegenwart von β-Hydroxybutyryl-CoA-DH gemessen (Abb. 8).

In einem zweiten Ansatz wurden außerdem ATP und Bicarbonat zugefügt und damit auch die Möglichkeit b), nämlich die Synthese und Beteiligung von Malonyl-CoA ermöglicht; in diesem Versuch lag die

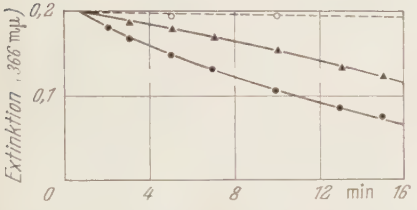


Abb. 8

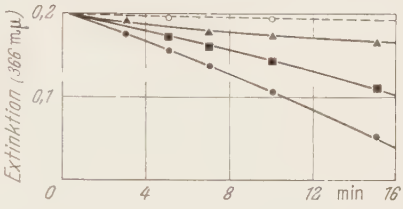


Abb. 9

Abb. 8. Test auf β-Ketothiolase: Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 0,50 ml K-PO_4-Puffer (pH 7,0; 50 μM); 0,03 ml Versen (3 μM); 0,05 ml Cystein (10 μM); 0,05 ml NADPH (1 μM); 0,40 ml Acetyl-CoA (0,67 μM); Rohextrakt (0,01 mg Protein) und Aqua dest. ad 1,10 ml. —o— NADPM; —▲— —▲— NADH; ---o--- ohne Substrat

Abb. 9. Test auf Acetyl-CoA-Carboxylase: Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 0,50 ml K-PO_4-Puffer (pH 6,5; 50 μM); 0,05 ml ATP (2 μM); 0,05 ml $MnCl_2$ (1 μM); 0,40 ml Acetyl-CoA (0,67 μM); 0,05 ml $KHCO_3$ (10 μM 7); 0,05 ml NADPH (1 μM); Rohextrakt (0,01 mg Protein und Aqua dest. ad 1,10 ml. —•— Ansatz wie angegeben; —▲— + Avidin (12 E); —■— ohne ATP und $KHCO_3$; ---o--- ohne Substrat

ermittelte Rate der NADPH-Oxydation höher als im Thiolase-Test. Eine Hemmung der Enzymreaktion durch zugesetztes Avidin deutete auf das Vorhandensein einer biotinabhängigen Acetyl-CoA-Carboxylase (Abb. 9). Beide Versuche erfolgten unter annähernd gleichen Testbedingungen, um nach Möglichkeit durch den Vergleich beider Enzymaktivitäten auf die Beteiligung des einen oder anderen Enzymsystems an der PHBS-Synthese schließen zu können. Die mit Rohextrakten angestellten Versuche und die Messung der NADPH-Oxydation allein reichen nicht aus, um zwischen beiden prinzipiellen Wegen zu unterscheiden. Im ersten Versuch war eine schwache Acetyl-Carboxylierung nicht auszuschließen; außerdem wird NADPH nicht nur zur Synthese von β-Hydroxybutyryl-CoA, sondern auch zur Synthese langkettiger Fettsäuren verbraucht. Im übrigen wichen die in den beschriebenen Ansätzen gemessenen Geschwindigkeiten des NADPH-Verbrauchs (Ansatz a: 0,298, Ansatz b: 0,400 μM NADPH/min/mg Protein) nur wenig voneinander ab.

Die durch die β-Hydroxybutyryl-CoA-DH katalysierte Synthese von β-Hydroxybutyryl-CoA aus Acetacetyl-CoA in Gegenwart von NADH ließ sich in reversibler Reaktion durch Einsetzen der spezifischen Substrate ebenfalls photometrisch bei 366 mμ verfolgen (Abb. 10 und 11). Die Reduktion bzw. Oxydation der Substrate lief mit NAD und NADH schneller ab als mit NADP und NADPH. Nach Lynen (1962) soll die

Fettsäuresynthetase in Hefen spezifisch sein für NADPH und das D(−)-β-Hydroxyacyl-derivat, während die freie β-Hydroxybutyryl-CoA-DH des Fettsäureabbaues nur mit NADH und L(+)-β-Hydroxybutyryl-CoA reagieren soll. Dies gäbe auch eine Erklärung für den unterschiedlichen Verbrauch der zugesetzten Di- und Triphosphopyridinnucleotide in den durch Hydrogenomonasextrakt katalysierten Enzymansätzen, da im Rohextrakt neben der Synthese von β-Hydroxybutyryl-CoA auch

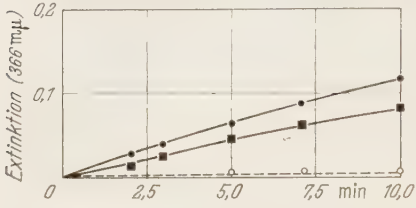


Abb. 10

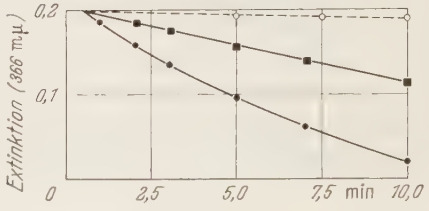


Abb. 11

Abb. 10. Nachweis der β-HBS-CoA-DH im optischen Test: Reduktion von NAD und NADP mit β-HBS-CoA als Substrat. Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 0,60 ml Tris-HCl-Puffer (pH 9,5; 60 μM); 0,03 ml Versen (3 μM); 0,05 m NAD (1 μM); 0,25 ml β-HBS-CoA (0,08 μM); 0,05 ml Cystein (10 μM); Rohextrakt (0,01 mg Protein) und Aqua dest. ad 1,10 ml. —•— NAD; —▪— NADP; ---o--- ohne Substrat

Abb. 11. Nachweis der β-HBS-CoA-DH im optischen Test: Oxydation von NADH und NADPH mit AcAc-CoA als Substrat. Die Cuvette (d = 1 cm) enthielt: 0,60 ml K-PO_4-Puffer (pH 6,5; 60 μM); 0,03 ml Versen (3 μM); 0,05 ml Cystein (10 μM); 0,20 ml AcAc-CoA (0,09 μM); 0,05 ml NADH (1 μM); Rohextrakt (0,01 mg Protein) und Aqua dest. ad 1,00 ml. —•— NADH; —▪— NADPH; ---o--- ohne Substrat

eine Synthese höherer Fettsäuren ablaufen kann und außerdem eine größere Affinität der CoA-Substrate zu der freien Dehydrogenase besteht.

Die β-Hydroxybuttersäure-DH, die am Abbau von PHBS beteiligt sein soll und absolut spezifisch ist für NAD und die D(−)-Form der β-Hydroxybuttersäure wurde angereichert und näher charakterisiert (SCHINDLER u. SCHLEGEL 1963).

Eine Trennung der Synthesewege von PHBS und höheren Fettsäuren in Rohextrakten von *Hydrogenomonas* ließ sich mit Hilfe der geschilderten Methoden nicht erreichen. Eindeutige Ergebnisse sind nur durch Isolierung der Enzymsysteme und durch Isotopenversuche zu erwarten. Durch Einsetzen von 1-C^{14}-Acetyl-CoA und 2-C^{14}-Malonyl-CoA und radiopapierchromatographische Analyse der Enzymansätze wurden Versuche eingeleitet, beide Synthesewege getrennt zu verfolgen. Es ist wahrscheinlich, daß einmal gebildetes Malonat — an die Fettsäuresynthetase gekoppelt — nur in höhere Fettsäuren eingebaut wird, während die niederen Fettsäuren als Bausteine von PHBS durch direkte Kondensation zweier Moleküle Acetyl-CoA entstehen.

C. Diskussion

Das Pyruvat-DH-System in Mikroorganismen wurde u. a. von den Arbeitskreisen um OCHOA (1954), STECKER et al. (1954), GUNSALUS (1952)

und von Reed (1953, 1958) untersucht. Besonders die Trennung und Anreicherung einzelner Enzymkomponenten von *E. coli* (Gunsalus 1954) und *S. faecalis* (Korkes et al. 1951) brachten Einsicht in den komplexen Vorgang der Pyruvat-Spaltung.

Krampitz et al. (1958, 1959) sowie Holzer (1955, 1961) vermochten den lange Zeit ungeklärten ersten Schritt der Pyruvat-Spaltung, nämlich die eigentliche Decarboxylierung unter Bildung von intermediärem 2(α-Hydroxyäthyl)-TPP, aufzuklären. Krampitz synthetisierte 2-(α-Hydroxyäthyl)-thiamin und setzte diese Verbindung mit Hilfe von Thiaminpyrophosphokinase in das für die Pyruvat-Decarboxylierung notwendige Coenzym TPP um. Holzer isolierte nach Inkubation von 2-C^{14}-Pyruvat mit gereinigter Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe den schon von Breslow diskutierten „aktiven Acetaldehyd".

Während nach der klassischen Theorie von Gunsalus (1954) die anschließende Oxydation des „aktivierten Acetaldehyds" durch α-Liponsäure unter Bildung von Acetyl-dehydro-α-liponsäure erfolgt und die Acetylgruppe schließlich durch eine Liponsäuretransacetylase (Chien u. Gunsalus 1954) auf Coenzym A übertragen wird, diskutiert Holzer (1961) die Möglichkeit, daß die Reduktion noch am TPP erfolgen könne mit Acetyl-TPP als Intermediärprodukt, wobei die Acetylgruppe direkt oder aber über x-Liponsäure auf Coenzym A übertragen würde.

Der nur durch Ionenaustauscher gereinigte Zellextrakt von *Hydrogenomonas* zeigte bei Prüfung der oxydativen Pyruvat-Decarboxylierung Abhängigkeit von den Cofaktoren NAD, TPP und Coenzym A und entspricht somit den aus tierischen Geweben und anderen Mikroorganismen gewonnenen Präparaten.

Die Beobachtung von de Busk u. Reed (1953) an Mutanten von *E. coli*, daß TPP und α-Liponsäure als einheitlicher Komplex in Form des Lipothiaminpyrophosphats gemeinsam reagieren, sind nicht wieder bestätigt worden.

Eine Abhängigkeit der Pyruvat-DH aus *Hydrogenomonas* von α-Liponsäure konnte in dem mit Dowex 1 gereinigten Rohextrakt nicht festgestellt werden. Dieser Cofaktor ist sehr fest an das Enzym gebunden und soll nur durch Reinigung mit Aluminiumhydroxyd-Gel von dem Protein-Komplex zu trennen sein (Gunsalus et al. 1952).

Goldman (1958, 1959) trennte die Pyruvat-DH aus *Mycobacterium* in zwei Fraktionen auf. Die erste Fraktion enthielt die Pyruvat-DH und Liponsäuretransacetylase, die zweite Fraktion die Liponsäure-DH. Es gelang ihm, S-Acetyl-Lip(SH) als Intermediärprodukt zu bestimmen (1960).

Vor kurzem haben Massey (1958), Massey u. Veeger (1961) und Searls u. Sanadi (1959) die von Straub beschriebene Diaphorase, die bekanntlich als Elektronenüberträger der x-Ketoglutarsäure-DH galt,

als FAD-Komponente der Liponsäure-DH identifiziert. Auch die Pyruvat-DH bzw. die Liponsäure-DH aus *E. coli* (REED u. KOIKE 1959, 1961), *Saccharomyces cerevisiae* (WREN u. MASSEY 1963), *Spinacea oleracea* (MATTHEWS u. REED 1963) und Rinderlebermitochondrien coll FAD enthalten.

Das Multienzym der Pyruvat-DH ließ sich neuerdings in drei Fraktionen aufspalten: in die Pyruvatcarboxylase, Liponsäure-Reduktase-Transacetylase und Dihydroliponsäure-DH. Die durch die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes säureamidartig an das Enzymprotein gekoppelte α-Liponsäure könnte nach KOIKE et al. (1963) als Vermittler zwischen den einzelnen aktiven Zentren auftreten.

Der in dieser Arbeit zusammengestellte, mit Arylamintransacetylase gekoppelte Enzymtest zur Bestimmung des Acetyl-CoA erfaßt die Gesamtreaktion der oxydativen Decarboxylierung. Eine Analyse der Pyruvatdecarboxylierung mit Hilfe des Taubenleberenzyms wurde schon von OCHOA (1954), HOLZER et al. (1955) und ALVAREZ et al. (1958) vorgenommen. Die spezifische Aktivität der Pyruvat-DH war im gekoppelten Test am höchsten, weil durch das Hilfsenzym das Reaktionsgleichgewicht zur Substratspaltung hin verschoben wurde. Die in einem anderen analytischen Verfahren gemessene NAD-Reduktionsrate war trotz zugesetzter Phosphotransacetylase geringer. Die manometrische Bestimmung der CO_2-Entwicklung durch zellfreie Extrakte und die ebenfalls im Warburgversuch gemessene O_2-Aufnahme durch ganze Zellen ergab fast gleiche Enzymaktivitäten.

HEATH et al. (1956) berichteten über die Bildung von Acetyl-P aus Pentosephosphaten durch Enzympräparate von *Lactobacillus pentosus*. Eine Fructose-P spaltende Ketolase wurde in *Acetobacter xylinum* entdeckt (SCHRAMM 1958) und auch in *Leuconostoc mesenteroides* konnte eine phosphorolytische Spaltung von Pentose- und Fructosephosphat festgestellt werden (HURWITZ 1958; CIFERRI u. BLAKLEY 1959; BUSSE et al. 1961). HOLZER reduzierte Ferrycyanid mit Pentose-5-P, Hydroxypyruvat oder Fructose-6-P und gereinigter Phosphoketolase aus *Lactobacillus plantarum* und gab — entsprechend der Transketolasereaktion — mit TPP verknüpften aktiven Glykolaldehyd als Zwischenprodukt an (HOLZER u. SCHRÖTER 1962; SCHRÖTER u. HOLZER 1963). DOBROGOSZ u. DEMOSS (1963a und b) beschrieben einen durch Phosphoketolase katalysierten Pentosestoffwechsel in *Pediococcus pentosaceus*.

Ein ebenfalls mit Arylamintransacetylase gekoppelter optischer Enzymtest zur Bestimmung der Phosphoketolase, der zunächst an Extrakten von *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactobacillus pentosus* erprobt worden war, diente zum Nachweis des Enzyms in *Hydrogenomonas* und in anderen oben angeführten Organismen. Eine lösliche Phosphoketolase konnte in keinem Falle nachgewiesen werden und scheint nur Milchsäurebakterien sowie *Acetobacter xylinum* eigen zu sein.

Langkettige Fettsäuren werden aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in Gegenwart von NADPH synthetisiert. Dabei dient Acetyl-CoA nur als Startsubstanz, während Malonyl-CoA den eigentlichen Baustein liefert. Die Synthese bis zum fertigen Endprodukt soll nicht über die Acyl-CoA-derivate erfolgen, sondern sämtliche Prozesse sollen am Multienzym vor sich gehen, wobei die Zwischenverbindungen enzymgebunden bleiben (Lynen 1962; Wakil u. Bressler 1962).

Demgegenüber wird PHBS in *Rhodospirillum rubrum* und *Bacillus megaterium* nur über das CoA-Derivat der β-Hydroxybuttersäure synthetisiert. β-Hydroxybutyryl-CoA entsteht in reversibler Reaktion aus Acetacetyl-CoA durch Katalyse der β-Hydroxybutyryl-CoA-DH. Dieses Enzym konnte neben der Fettsäuresynthetase gesondert isoliert werden (Wakil u. Bressler 1962). Stansly u. Beinert (1953) erhielten auf umgekehrtem Wege der Knoopschen β-Oxydation niedere Fettsäuren bis zum Butyryl-CoA.

Hinsichtlich der Biosynthese kurzkettiger Fettsäuren (Buttersäure, Capronsäure) und deren Reduktionsprodukte (Butanol), bzw. deren Derivate (Aceton, Isopropanol), die von Clostridien ausgeschieden werden, und der in polymerisierter Form als Speicherprodukt vorliegenden β-Hydroxybuttersäure ist die Beteiligung von Malonyl-CoA noch nicht sichergestellt. Aus energetischen Gründen ist es unwahrscheinlich, daß in die Buttersäure-Synthese durch Clostridien noch ein zusätzlicher ATP-verbrauchender Schritt eingeschaltet sein sollte. Goldman et al. (1963) haben experimentelle Befunde beigebracht, daß die Synthese niederer und langkettiger Fettsäuren in *E. coli* und *Cl. kluyveri* offensichtlich getrennt verläuft, da in Enzymansätzen selbst bei Zugabe von markiertem Malonyl-CoA die Butyrat-Synthese in der Hauptsache über Acetyl-CoA führte.

Für die Biosynthese der β-Hydroxybuttersäure in PHBS-speichernden Bakterien liegen solche Untersuchungen noch nicht vor. Lediglich die eigenen, mit radioaktivem Acetyl-CoA und Malonyl-CoA eingeleiteten Versuche scheinen die Ergebnisse von Goldman zu bestätigen. Demnach würde die Synthese von PHBS im Gegensatz zur Lipid-Synthese durch direkte Kondensation zweier Moleküle Acetyl-CoA eingeleitet.

Zusammenfassung

1. Zur Prüfung von zellfreien Extrakten aus *Hydrogenomonas* auf Pyruvat-Dehydrogenase und Phosphoketolase wurde ein mit Arylamintransacetylase gekoppelter Enzymtest zusammengestellt.

2. Für die Pyruvat-Dehydrogenase wurden nach diesem Test höhere Enzymaktivitäten ermittelt als nach Messungen der NAD-Reduktion und der manometrischen Bestimmung der CO_2-Entwicklung und des O_2-Verbrauchs.

3. Es wurde die Kinetik der Acetyl-CoA-Bildung aus Pyruvat, Lactat und Acetat an C-autotroph und heterotroph gewachsenen Zellen verfolgt. Die Pyruvat-Dehydrogenase war in den auf Succinat gewachsenen Zellen doppelt so aktiv wie in den autotroph oder mit Acetat gezogenen Zellen. Die Acetat-thiokinase war in den Acetat-Zellen am aktivsten.

4. Phosphoketolase ließ sich zwar in *Leuconostoc mesenteroides* und *Lactobacillus pentosus* nachweisen, nicht aber in *Hydrogenomonas*, *Micrococcus denitrificans*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus niger* und Haselnüssen.

5. Im optischen Test wurden in *Hydrogenomonas*-Extrakten β-Ketothiolase und β-Hydroxybutyryl-CoA-DH nachgewiesen. Die Beteiligung von Malonyl-CoA an der Synthese kurz- und langkettiger Fettsäuren wurde diskutiert.

Summary

1. A photometric test employing arylamine acetyltransferase for examination of pyruvate-dehydrogenase and phosphoketolase in cell-free extracts of *Hydrogenomonas* was developed.

2. By means of this test higher enzyme activities were obtained for pyruvate-dehydrogenase than by measurements of NAD-reduction and manometric determinations of CO_2-evolution and O_2-uptake.

3. The kinetics of acetyl-CoA-formation from pyruvate, lactate, and acetate were observed with C-autotrophically as well as with heterotrophically grown cells. The pyruvate-dehydrogenase was twice as active in cells grown on succinate as in those cells grown under autotrophic conditions or with acetate. The acetyl-CoA synthetase was most active in the acetate-grown cells.

4. Phosphoketolase was found to be present in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus pentosus* but not in *Hydrogenomonas*, *Micrococcus denitrificans*, *Bacillus megaterium*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus niger* and hazel-nuts.

5. Using optical tests β-ketothiolase and β-hydroxybutyryl-CoA-DH could be demonstrated in extracts of *Hydrogenomonas*. The participation of malonyl-CoA in the synthesis of short- and long-chain fatty acids was discussed.

Herrn Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL bin ich für die Überlassung des Themas und für die Anleitung zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

ALTERMATT, H. A., A. C. BLACKWOOD, and A. C. NEISH: The anaerobic dissimilation of D-xylose-I-C^{14}, D-xylose-2-C^{14} and D-xylose-5-C^{14} of *Leuconostoc mesenteroides*. Canad. J. Biochem. **32**, 622—626 (1955).

ALVAREZ, A., E. VANDERWINKEL et J. U. WIAME: L'oxydation de l'acide pyruvique chez la levure. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **28**, 333—340 (1958).

Bergmann, F. H., J. C. Towne, and R. H. Burris: Assimilation of carbon dioxyde by hydrogen bacteria. J. biol. Chem. **230**, 13—23 (1958).

Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1962.

Bressler, R., and S. J. Wakil: Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. IX. The conversion of malonyl-CoA to long chain fatty acids. J. biol. Chem. **236**, 1643—1651 (1961).

Bücher, T.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **1**, 292—314 (1947).

De Busk, G. B., and L. J. Reed: Coenzymatic functions of thiamine pyrophosphate and lipothiamine pyrophosphate. Fed. Proc. **12**, 193—194 (1952).

Busse, M., P. K. Kindel, and M. Gibbs: The heterolactic fermentation. III. Position of C^{14} in the products of fructose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. J. biol. Chem. **236**, 2850—2853 (1961).

Chou, T. C., and F. Lipmann: Separation of acetyl transfer enzymes in pigeon liver extract. J. biol. Chem. **196**, 89—103 (1952).

Chowdhury, A. A.: Poly-β-hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. Dissertation. Göttingen 1963. Arch. Mikrobiol. **47**, 167—200 (1963).

Ciferri, O., and E. R. Blakley: The metabolism of 2-keto-D-gluconate by cell-free extracts of *Leuconostoc mesenteroides*. Canad. J. Microbiol. **5**, 547—560 (1959).

Chein, C. H., and I. C. Gunsalus: A lipoic acid-mediated synthesis of acetoin from acetylphosphate ($AcPO_4$) by *E. coli*. Fed. Proc. **13**, 191—192 (1954).

Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: Methods in enzymology, Vol. 1. New York: Academic Press Inc. Publ. 1955.

Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure. Stuttgart: F. Enke 1959.

Dobrogosz, W. J., and R. D. Demoss: Studies on the regulation of ribosephosphate-isomerase activity in *Pediococcus pentosaceus*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **77**, 629—638 (1963).

— — Pentose utilization by *Pediococcus pentosaceus*. J. Bact. **85**, 1356—1364 (1963).

Gibson, D. M., E. B. Titchener, and S. J. Wakil: Requirement for bicarbonate in fatty acid synthesis. J. Amer. chem. Soc. **80**, 2908 (1958).

Goldman, D. S.: Enzyme systems in the Mycobacteria. V. The pyruvic dehydrogenase system. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **27**, 513—518 (1958).

— Enzyme systems in the Mycobacteria. VI. Further studies on the pyruvic dehydrogenase system. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **32**, 80—95 (1959).

— Enzyme systems in the Mycobacteria. IX. The reductive acetylation of lipoic acid. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **45**, 279—289 (1960).

Goldman, P., A. W. Alberts, and P. R. Vagelos: The condensation reaction of fatty acid biosynthesis. II. Requirement of the enzymes of the condensation reaction for fatty acid synthesis. J. biol. Chem. **238**, 1255—1261 (1963).

Gottschalk, G.: Die Biosynthese der Poly-β-hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. II. Verwertung organischer Säuren. Arch. Mikrobiol. **47**, 230—235 (1964a).

— Die Biosynthese der Poly-β-hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. III. Synthese aus Kohlendioxyd. Arch. Mikrobiol. **47**, 236—250 (1964b).

Gunsalus, I. C., L. Struglia, and D. I. O'Kane: Pyruvic acid metabolism. IV. Occurrence, properties and partial purification of pyruvate oxidation factor. J. biol. Chem. **194**, 859—869 (1952).

— Grouptransfer and acyl-generating functions of lipoic derivates. Mechanism of enzyme action: McElroy, W. D., and B. Glass. Baltimore: Hopkins 1954.

HEATH, E. C., J. HURWITZ, and B. L. HORECKER: Acetyl phosphate formation in the phosphorolytic cleavage of pentose phosphate. J. Amer. chem. Soc. **78**, 5449 (1956).

HIRSCH, P., G. GEORGIEV u. H. G. SCHLEGEL: CO_2-Fixierung durch Knallgasbakterien. III. Autotrophe und organotrophe CO_2-Fixierung. Arch. Mikrobiol. **46**, 79—95 (1963).

HOLZER, H.: Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat. Angew. Chem. **73**, 721—727 (1961).

— H. W. GOEDDE u. S. SCHNEIDER: Umsatz von Oxybrenztraubensäure und Glykolaldehyd mit Carboxylase und Alkoholdehydrogenase aus Hefe. Biochem. Z. **327**, 245—254 (1955).

—, u. W. SCHRÖTER: Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase. I. Oxydation verschiedener Substrate mit Ferricyanid zu Glykolsäure. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **65**, 271—288 (1962).

HÜBENER, H. J.: Über die Extraktion von Mikroorganismen durch Ultraschall mit einer neuen Apparatur. Biochem. Z. **331**, 410—421 (1959).

HUGHES, D. E.: A press for disrupting bacteria and other microorganisms. Brit. J. exp. Path. **32**, 97—109 (1951).

HURWITZ, J.: Pentose phosphate cleavage by *Leuconostoc mesenteroides*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **28**, 595—602 (1958).

—, u. B. L. HORECKER: The purification of phosphoketopentoepimerase from *Lactobacillus pentosus* and the preparation of xylulose-5-phosphate. J. biol. Chem. **223**, 993—1008 (1956).

— A. WEISSBACH, B. L. HORECKER, and P. Z. SMYRNOTIS: Spinach phosphoribokinase. J. biol. Chem. **218**, 769—783 (1956).

KALTWASSER, H., G. VOGT u. H. G. SCHLEGEL: Polyphosphatsynthese während der Nitrat-Atmung von *Micrococcus denitrificans* Stamm *11*. Arch. Mikrobiol. **44**, 259—265 (1962).

KAPLAN, N. O., and F. LIPMANN: The assay and distribution of coenzyme A. J. biol. Chem. **174**, 37—44 (1948).

KOIKE, M., L. J. REED, and W. R. CARROL: α-Ketoacid dehydrogenation complexes. IV. Resolution and reconstitution of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenation complex. J. biol. Chem. **238**, 30—39 (1963).

KRAMPITZ, L. O., G. GREULL, CH. S. MILLER, J. B. BICKING, H. R. SKEGGS, and J. M. SPRAGUE: An active acetaldehyde-thiamine intermediate. J. Amer. chem. Soc. **80**, 5893—5894 (1958).

— G. GREULL, and I. SUZUKI: An active acetaldehyde-thiamine intermediate. Fed. Proc. **18**, 266 (1959).

LJUNGREN, G.: Darstellung von Acetessigsäurelösung. Biochem. Z. **145**, 422—425 (1924).

LYNEN, F.: Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle. Fed. Proc. **12**, 683—691 (1953).

— Die Multienzym-Struktur der Fettsäuresynthese. Vortr. Ges. f. physiol. Chem., Wien 1962.

MACRAE, R. M., and J. F. WILKINSON: Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. J. gen. Microbiol. **19**, 210—222 (1958).

MASSEY, V.: The identity of diaphorase and lipoic dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **30**, 205—206 (1958).

—, and C. VEEGER: Studies on the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **48**, 33—47 (1961).

Matthews, J., and L. J. Reed: Purification and properties of a dihydrolipoic dehydrogenase from *Spinacea oleracea*. J. biol. Chem. **238**, 1869—1876 (1963).
McIlwain, H.: Preparation of cell-free bacterial extracts with powdered alumina. J. gen. Microbiol. **2**, 288—291 (1948).
Merrick, J. H., and M. Doudoroff: Enzymatic synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid in bacteria. Nature (Lond.) **189**, 890—892 (1961).
Ochoa, S.: Enzymatic mechanism in the citric acid cycle. Advanc. Enzymol. **15**, 183—270 (1954).
Ramakrishnan, C. V., and S. M. Martin: The enzymatic synthesis of citric acid by cell-free extracts of *Aspergillus niger*. Canad. J. Biochem. **32**, 434—439 (1954).
Reed, L. J.: Metabolism and function of lipoic acid. Inter. Symp. Enzyme Chem. Tokyo and Kyoto (1957), 71—77 (1958).
—, and B. G. de Busk: Mechanism of enzymatic oxidative decarboxylation of pyruvate. J. Amer. chem. Soc. **75**, 1261—1262 (1953).
—, and M. Koike: Identification of *Escherichia coli* fraction B (dihydrolipoic dehydrogenase) as a flavoprotein. Fed. Proc. **18**, 308 (1959).
— Resolution of pyruvate and α-ketoglutarate dehydrogenation complex. Fed. Proc. **20**, 238 (1961).
la Rivière, J. W. M.: On the microbial metabolism of the tartaric acid isomeres. Dissertation. Delft 1958.
Schindler, J., u. H. G. Schlegel: D(—)-β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase aus *Hydrogenomonas H 16*. Biochem. Z. **339**, 154—161 (1963).
Schlegel, H. G., H. Kaltwasser u. G. Gottschalk: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **38**, 209—222 (1961).
—, u. G. Gottschalk: Poly-β-hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese. Angew. Chem. **74**, 342—347 (1962).
Schramm, M., V. Klybas, and E. Racker: Phosphorolytic cleavage of fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Acetobacter xylinum*. J. biol. Chem. **233**, 1283—1288 (1958).
Schröter, W., u. H. Holzer: Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase. II. Umsatz von Thiaminpyrophosphat aktiviertem Glycolaldehyd. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **77**, 474—481 (1963).
Searls, R. L., and D. R. Sanadi: Dihydrothioctyl dehydrogenase — a flavoprotein. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 697—701 (1959).
Simon, E. J., and D. Shemin: The preparation of S-succinyl coenzyme A. J. Amer. chem. Soc. **75**, 2520 (1953).
Stansly, P. G., and H. Beinert: Synthesis of butyryl-coenzyme A by reversal of the oxidative pathway. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **11**, 600—601 (1953).
Strecker, H. J., and S. Ochoa: Pyruvate oxidation system and acetoin formation. J. biol. Chem. **209**, 313—326 (1954).
Stumpf, P. K., and B. L. Horecker: The role of xylulose-5-P in xylose metabolism of *Lactobacillus pentosus*. J. biol. Chem. **218**, 753—768 (1956).
Wakil, S. J., and R. Bressler: Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. X. Reduced triphosphopyridine nucleotide — acetoacetyl coenzyme A reductase. J. biol. Chem. **237**, 687—693 (1962).
Wren, A., and V. Massey: Lipoyl dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. **89**, P 47 (1963).

Dr. J. Schindler,
z. Zt. Department of Microbiology, Western Reserve University, Cleveland, Ohio, U.S.A.

Lebenslauf

Am 2. 5. 1935 wurde ich, Joachim Schindler, als Sohn des Bibliothekars Wolfgang Schindler und seiner Ehefrau Maria, geb. Lindemann, in Königsberg/Pr. geboren. Nach Besuch der Grundschule in Königsberg bis 1944 erfolgte 1947 die Aufnahme an das humanistische Max-Planck-Gymnasium zu Göttingen. Meine Schulzeit schloß ich 1956 mit der Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der Göttinger Georg-August-Universität für das Fach Biologie. 1958 studierte ich je ein Semester in Wien und Tübingen, um im Sommer-Semester 1959 mein Studium in Göttingen fortzusetzen. Anfang 1960 begann ich mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.

Meinen akademischen Lehrern bin ich zu großem Dank verpflichtet. Es sind dies die Herren Professoren Brockmann, Bünning, Deuticke, Firbas, Flammersfeld, Geitler, Glemser, Harder, Hilsch, Höfler, R. Meyer, Pirson und Schlegel.